



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**ANNA CAROLINA FONSECA DE MATTOS
LUANNA SILVA BARRETO**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM
*SALMONELLA HEIDELBERG***

Brasília

2023



**ANNA CAROLINA FONSECA DE MATTOS
LUANNA SILVA BARRETO**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM
*SALMONELLA HEIDELBERG***

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientador: Prof. Msc. Lorena Cunha Mota

Brasília
2023

RESUMO

A produção avícola desempenha um papel crucial no atendimento à crescente demanda global por proteína animal, mas enfrenta desafios significativos relacionados à segurança alimentar. A presença da bactéria patogênica *Salmonella Heidelberg* em rebanhos avícolas é uma ameaça persistente tanto para a saúde pública quanto para a economia. Esta cepa de *Salmonella* é conhecida por sua capacidade de causar infecções em aves e humanos, representando um sério risco. O objetivo central deste projeto é realizar uma avaliação ampla da prevalência da *Salmonella Heidelberg* em aves de criação, bem como investigar sua interação com os tecidos-alvo, incluindo baços e tonsilas, por meio da análise de lâminas histológicas para obter uma caracterização detalhada do agente patogênico. Para atingir esse objetivo, serão coletadas amostras de aves saudáveis e também de aves desafiadas com *Salmonella Heidelberg*. Além disso, serão investigados fatores de risco associados à disseminação da bactéria entre aves de corte e poedeiras. A análise de lâminas histológicas desempenhará um papel crucial na compreensão da *Salmonella Heidelberg*, fornecendo informações detalhadas sobre como a bactéria interage com os tecidos das aves. Isso possibilitará uma compreensão mais profunda dos mecanismos de infecção e patogenicidade. Além disso, o projeto avaliará o impacto econômico e de saúde pública da presença da *Salmonella Heidelberg* nas cadeias de produção de alimentos. Os resultados deste estudo serão de grande valor para a indústria avícola, reguladores governamentais e a comunidade científica. Eles contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes, melhorando a segurança alimentar e reduzindo o risco de infecções alimentares causadas pela *Salmonella Heidelberg*. Os resultados obtidos foram satisfatórios devido ao fato de conseguir-se notar aumento significativo de linfócitos em lâminas desafiadas pela do que as lâminas não desafiadas, concluindo que a bactéria provoca drásticas alterações histológicas no organismo do animal.

Palavras-chave: *Salmonella Heidelberg*; histologia; aves; bactéria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	4
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
3	METODOLOGIA.....	10
3.1	Exames histopatológicos.....	10
3.2	Contagem de linfócitos em órgãos linfóides secundários.....	10
3.3	Metodologia atual.....	11
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	13
5	CONCLUSÃO.....	15
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

A intensificação da produção de frangos de corte proporcionou ao Brasil ocupar lugar de destaque no ranking mundial de maiores produtores e exportadores de carne de frango. Entretanto, a intensificação na produtividade tem como ônus a alta densidade de animais dentro dos galpões de criação, submetendo-os às condições extremas de saúde, em que a propagação de microorganismos patogênicos é facilitada (ALMEIDA, 2018).

Visto isso, doenças como a Salmonelose acabam se propagando com maior facilidade, estas bactérias acabam sendo de relevância para o Programa de Nacional de Sanidade Avícola brasileiro, consolidado em 1994 pelo MAPA pois além de serem patógenos que acometem os animais, também são conhecidos por causarem transtornos à saúde humana, sendo, portanto, um relevante problema de saúde pública, até mesmo em países bem desenvolvidos, gerando impactos na sociedade e na economia avícola (ALMEIDA, 2018).

Ademais a Salmonela é bacilo gram negativo que possui diversos tipos de sorovares, trazendo destaque para Salmonella Heidelberg, que tem se mostrado mais frequente na avicultura em diversos países, como o Sul do Brasil, sendo este um dos sorovares mais reportados em humanos e causando diversos sintomas como, dor abdominal, febre e diarreia, podendo levar a uma intoxicação alimentar e em casos raros, pode provocar graves infecções e até mesmo a morte. Portanto, sendo necessária maior atenção estudos sobre este patógeno (ALMEIDA, 2018).

A indústria avícola desempenha um papel crucial na produção de alimentos, contribuindo significativamente para a oferta global de proteínas de alta qualidade. No entanto, a presença da bactéria Salmonella Heidelberg representa uma ameaça substancial à saúde pública e à segurança alimentar, uma vez que essa cepa de Salmonella é frequentemente associada a casos de infecções alimentares em humanos. A gravidade das infecções por Salmonella Heidelberg reside na sua resistência a antibióticos comuns, o que aumenta a dificuldade de tratamento e pode levar a complicações graves.

Além dos impactos em humanos, a infecção por Salmonella Heidelberg também pode afetar o bem-estar das aves de corte. A compreensão das alterações histológicas nos tecidos das aves é fundamental para implementar medidas de manejo que minimizem o sofrimento dos animais e promovam o bem-

estar animal.

Este projeto propõe-se a avaliar as alterações histológicas em frangos de corte desafiados com *Salmonella Heidelberg*, com o objetivo de contribuir para um entendimento mais profundo dos efeitos dessa bactéria nas aves, para que possa facilitar os estudos, além de possibilitar o tratamento e prevenção dessa zoonose.

O objetivo geral é avaliar alterações histológicas em aves de corte que foram identificadas a infecção por *Salmonella Heidelberg*. Já os objetivos específicos se caracteriza em coletar amostras de tecidos de frangos de corte desafiados e não desafiados com *Salmonella Heidelberg*, realizar análises histológicas detalhadas dessas amostras e comparar os resultados histológicos entre os grupos desafiados e não desafiados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A *Salmonella Heidelberg* é um bacilo Gram negativo, aeróbio facultativo e não formador de esporos que se comporta como patógeno intracelular facultativo, do Filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae, cuja principal forma de transmissão é pela via fecal-oral sendo que a *Salmonella Heidelberg* é identificada em diversos locais dentro do ambiente de produção avícola, abrangendo elementos como água, solo, ração e as próprias instalações.

A contaminação ambiental representa uma fonte recorrente de infecção, uma vez que as aves entram em contato com as fezes ou secreções que contêm o mencionado patógeno. Adicionalmente, a presença de aves portadoras assintomáticas desempenha um papel significativo na propagação da *Salmonella Heidelberg*. Algumas dessas aves, aparentemente saudáveis, podem alojar a bactéria em seus tratos gastrointestinais e eliminá-la nas fezes.

Consequentemente, o contato direto ou indireto com esses animais pode resultar na transmissão da infecção. As instalações destinadas à produção avícola, como galpões, equipamentos e sistemas de transporte, têm o potencial de serem reservatórios para a *Salmonella Heidelberg*. Se esses ambientes não forem adequadamente higienizados e mantidos, existe o risco de que as aves sejam expostas ao patógeno.

Embora menos frequente, a transmissão vertical da *Salmonella Heidelberg* também é possível, com mães infectadas transmitindo a bactéria para seus ovos. Essa rota pode resultar em pintinhos infectados desde o momento do nascimento. Não menos importante, vale mencionar que os seres humanos podem igualmente desempenhar o papel de vetores na disseminação da *Salmonella Heidelberg*.

Isso ocorre quando pessoas, incluindo funcionários de granjas, entram em contato direto ou indireto com o patógeno e, em seguida, transportam-no da produção avícola para outros locais. Isso pode ser observado, por exemplo, quando funcionários da granja não adotam medidas apropriadas de higiene pessoal e práticas de biossegurança adequadas.

Conforme o esquema de Kauffman-White, mais de 2.500 sorovares de *Salmonella* são classificados de acordo com seus antígenos, H (flagelar), O (somático) e ocasionais. Vi (capsular), sendo que o sorovar *Heidelberg* é citado

como o terceiro isolado mais comum na indústria avícola canadense e o quarto mais comum nos Estados Unidos.

Dependendo do sorovar envolvido, da quantidade inoculada, dos fatores de virulência expressos pelo agente e do estado imunológico do hospedeiro, a *Salmonella* pode causar infecções que variam de gastrointestinais leves a uma infecção sistêmica. No entanto, para poder desenvolver a doença, ela deve estar no ambiente certo para poder se estabelecer, replicar e expressar seus fatores de virulência (SCHWARTZ, 2000).

A patogenia da *Salmonella* Heidelberg engloba uma série de eventos complexos que ocorrem desde a entrada do patógeno no organismo hospedeiro até o desenvolvimento da infecção. Inicialmente, o processo de infecção é desencadeado pela adesão das bactérias da *Salmonella* Heidelberg à superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal do hospedeiro. Nesse sentido, a *Salmonella* utiliza estruturas especializadas, tais como fímbrias e proteínas de adesão, para promover sua fixação às células hospedeiras (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

Uma vez estabelecida a adesão, a bactéria inicia o processo de colonização da mucosa intestinal. Esse estágio é seguido pela capacidade intrínseca da *Salmonella* Heidelberg de invadir as células do epitélio intestinal, por meio de um mecanismo que implica a inserção de proteínas na membrana da célula hospedeira, permitindo, assim, sua entrada no interior da célula. Vale ressaltar que essa invasão representa um passo crítico para o estabelecimento efetivo da infecção (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

Com a bactéria agora dentro das células hospedeiras, a *Salmonella* Heidelberg inicia sua replicação, formando compartimentos intracelulares seguros conhecidos como "vacúolos fagossômicos". Esse ambiente protegido permite que a bactéria sobreviva e se multiplique, evitando as defesas do sistema imunológico do hospedeiro (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

A infecção por *Salmonella* Heidelberg pode resultar em lesões no epitélio intestinal, dando origem a sintomas clínicos, tais como diarreia, dor abdominal, febre e, em casos mais graves, desidratação. A gravidade desses sintomas pode variar consideravelmente, dependendo do sorovar específico da *Salmonella*, da dose infectante e do estado de saúde do hospedeiro (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

Por fim, é importante mencionar que, em determinadas situações, o hospedeiro pode conseguir eliminar a infecção por *Salmonella Heidelberg*, enquanto em outros casos, a bactéria persiste no organismo por um período prolongado, tornando-se uma fonte crônica de infecção ou resultando em um estado de portador assintomático.

Dessa forma, a capacidade da *Salmonella* de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro como, por exemplo, pH estomacal, temperatura elevada, baixa tensão de oxigênio (O₂), hiperosmolaridade, ação da bile e peristaltismo, baseia-se na capacidade de modular seus genes de virulência em resposta a estas condições (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

A interação do agente com o epitélio, além da invasão, resulta também na produção de moléculas sinalizadoras pelas células epiteliais. A produção de IL-8 e do químico-atrator epitelial induzido por patógeno, pelas células epiteliais, estimula inflamação e migração de leucócitos, que por sua vez, produzem prostaglandinas. No entanto, somente a invasão das células da mucosa não é suficiente para causar diarreia, possivelmente a produção de enterotoxinas também seja responsável ou contribua para o estabelecimento do quadro (DARWIN & MILLER, 1999).

O tratamento da infecção por *Salmonella Heidelberg* envolve principalmente cuidados de suporte e, em casos graves, o uso de antibióticos. Essas medidas visam aliviar os sintomas e prevenir complicações, adaptando-se à gravidade da infecção e às necessidades do paciente. É essencial manter uma hidratação adequada, especialmente em crianças e idosos, controlar sintomas como febre e dor abdominal com medicamentos apropriados.

O tratamento da infecção por *Salmonella Heidelberg* em animais, como aves de criação, envolve uma abordagem multifacetada. Inicialmente, é crucial isolar os animais doentes e implementar quarentenas para impedir a disseminação do patógeno. A manutenção de um ambiente higiênico, incluindo a limpeza regular de instalações e a eliminação apropriada de fezes, é essencial.

Além disso, medidas de controle de vetores, o uso criterioso de antibióticos sob supervisão veterinária, o acompanhamento profissional regular e, em algumas situações, as vacinações podem ser adotadas de acordo com o médico veterinário responsável. A prevenção, através de práticas de manejo adequadas e medidas de biossegurança, permanecem como a estratégia principal para o controle eficaz

da Salmonella Heidelberg em animais.

Além de ser prejudicial ao homem e aos animais, a Salmonella é importante destacar que a infecção por Salmonella Heidelberg não afeta apenas a saúde humana e animal, mas também tem implicações econômicas significativas. Epidemias de infecções alimentares associadas a produtos avícolas contaminados podem resultar em recalls massivos de alimentos e interrupções na cadeia de abastecimento, gerando custos substanciais para a indústria alimentícia e afetando a confiança dos consumidores.

Portanto, a pesquisa que propomos realizar, avaliando as alterações histológicas em frangos de corte desafiados com Salmonella Heidelberg, não apenas contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos patogênicos dessa bactéria em aves, mas também terá implicações práticas importantes para a indústria avícola, a segurança alimentar e a saúde pública, ao fornecer dados valiosos para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes.

3. METODOLOGIA

3.1 Exames histopatológicos

Fragmentos dos rins, fígado, tonsilas cecais duodeno e jejuno serão coletados e processados de acordo com a metodologia convencional de Luna (1968). Após serem fixadas por 24h em solução de formalina neutra tamponada a 10%, os fragmentos serão recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, serão lavados em água corrente para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto.

Posteriormente, proceder-se-á à clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica, com ponto de fusão a 56 °C. Os fragmentos de 5,0 mm serão incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a 5,0 µm em micrótomo rotativo, marca American-Optical, modelo Spencer-820, utilizando navalhas descartáveis, laminados, e coradas pelo método de Hematoxilina – Eosina (HE), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

3.2 Contagem de linfócitos em órgãos linfóides secundários

Para a contagem de linfócitos serão colhidos fragmentos de baço e tonsilas cecais de aves diagnosticadas com *Salmonella Heidelberg*, os quais serão fixados em formalina tamponada a 10%, durante 24h, processados e incluídos em parafina. Em seguida, serão confeccionados cortes de 5µm, que serão distendidos sobre lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina (HE). Para a contagem dos linfócitos será utilizada a técnica de planimetria por contagem de pontos, sendo o número de campos fotografados de cada amostra determinado por meio de média acumulada, de acordo com o proposto por Williams (1977).

Para isso, serão capturadas as imagens de 10 campos de cada um dos fragmentos de baço e tonsila cecal de cada animal com campo de aumento de 40x, para a posterior contagem dos linfócitos, realizada com o auxílio do software Image J. Um retículo quadrangular composto por 25 pontos será sobreposto à imagem histológica digital e apenas serão contados os linfócitos nas intersecções presentes no campo visual. Os linfócitos contados no baço e tonsila cecal serão classificados quanto ao grau de proliferação e classificados em ausente: menos de 10% de aumento de linfócitos; discreto: entre 10,1 a 20% de proliferação de linfócitos;

moderado: entre 20,1 a 40% de proliferação de linfócitos e acentuado: acima de 40.1% de proliferação de linfócitos. Preliminarmente, será realizada a contagem dos linfócitos no baço e tonsilas cecais do grupo controle, obtendo-se a média para efeito de comparação e referência na determinação do grau de aumento linfoide nos órgãos dos animais inoculados.

3.3 Metodologia atual

Foram-se utilizadas amostras, previamente coletadas em 2018, pela orientadora deste projeto, já conservadas e fixadas em formalina para manter suas estruturas preservadas, visto que as amostras consistiam em pedaços de tecido do baço e das tonsilas de aves de corte sadias e aves de corte desafiadas pela *Salmonella Heidelberg*. Após receber as amostras, foi-se realizada a confecção das lâminas histológicas, na qual se constitui os seguinte passos: desidratação, inclusão para realizar os cortes, montagem em lâminas secas com resina para aderir o tecido ao vidro, utilização de corante para a visualização, hematoxilina eosina e, então, realização da montagem final para prosseguir com a microscopia, onde as lâminas histológicas preparadas são, por conseguinte, examinadas ao microscópio para análise e documentação das características histológicas do tecido.

Ao todo foram viáveis 37 lâminas histológicas, divididas em 4 grupos, baços desafiados e baços não desafiados, tonsilas desafiadas e tonsilas não desafiadas. Nesse sentido, obtivemos 11 lâminas da amostra de baço das aves desafiadas pelo agente e 8 lâminas do baço das aves não desafiadas, bem como as tonsilas obtivemos 11 lâminas das aves desafiadas e 7 lâminas das aves não desafiadas.

As análises foram realizadas no laboratório, ofertado pelo Labocien Uniceub, aonde foram tiradas 10 fotos de diferentes quadrantes pelo microscópio de cada uma das lâminas, onde posteriormente foi executada a contagem de linfócitos em cada imagem de forma manual, para não gerar enviesamento as análises foram feitas, de modo há preservar a contingência do estudo sobre a carência ou não da bactéria sobre as respectivas lâminas. Vale ressaltar que os dados obtidos foram organizados em uma planilha Excel para serem utilizados nas estatísticas e, por fim, gerarem os devidos resultados.

Para analisar os dados de contagem de linfócitos nas laminas será utilizado teste descritivo considerando a frequência encontrada nas variáveis, sendo

submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias serão comparadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparar as médias entre os tratamentos abaixo. Foi considerando 0,05 para o P-value (Tabela 1). Entre os grupos de aves desafiadas foi encontrado maior presença de linfócitos no baço. Porém, entre os grupos de aves não desafiadas ambos apresentaram número de linfócitos semelhantes.

Quando comprados todos os grupos, os não desafiados apresentaram menor número de linfócitos no baço e tonsilas, em seguida, no grupo das aves desafiadas onde foi analisado o número de linfócitos nas tonsilas foi encontrado 84,83 unidades em média, por último, o grupo das aves desafiadas em que foi analisado o número de linfócitos no baço apresentou o maior número de unidades 200,83 unidades.

Tabela 1. Comparação entre as médias dos tratamentos no teste histoquímico de aves domésticas rústicas melhoradas geneticamente.

Tratamentos	Média
desafiados tonsilas	84,83 Ab
desafiados baço	200,83 Bc
não desafiados tonsilas	64,33 Aa
não desafiados baço	64,83 Aa
CV	3,287382
p-value	0,000752

Figura 1: Primeiramente lamina 173 de baço desafiado com Salmonella Heidelberg e ao lado lamina 172 de baço não desafiado.

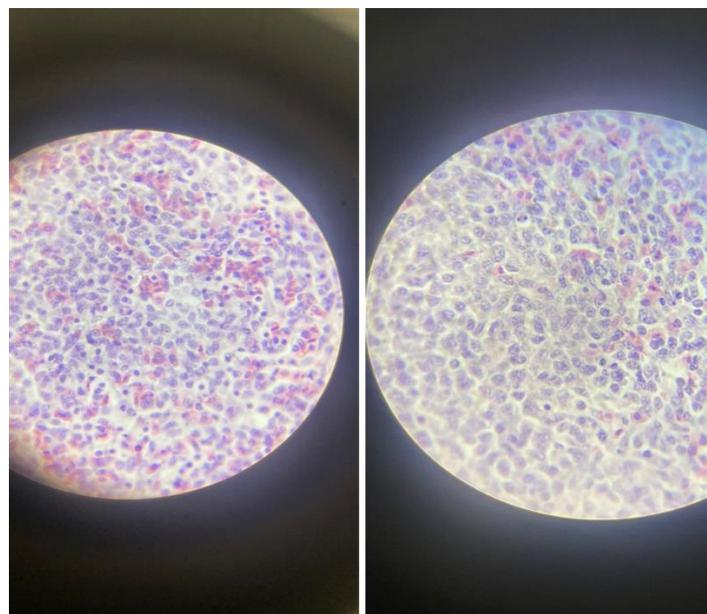
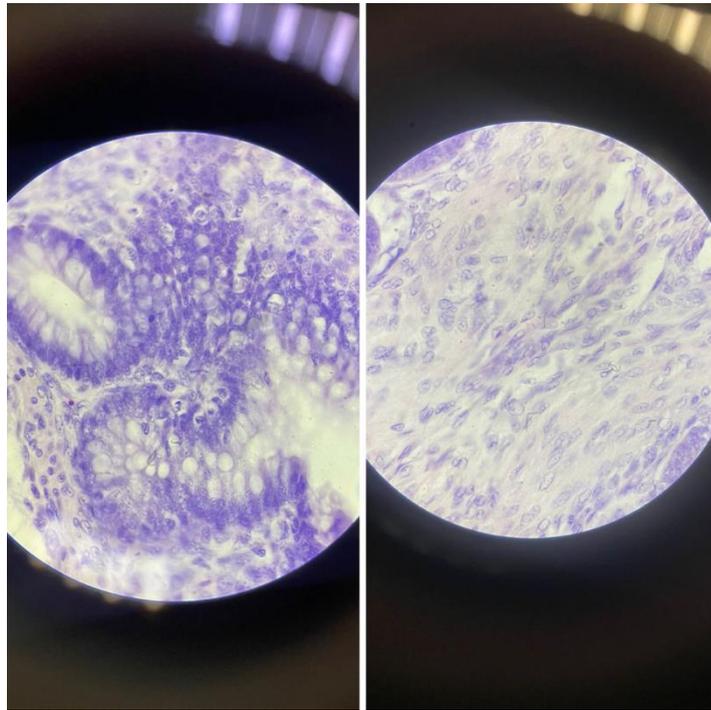


Figura 2: Primeramente lamina 216 de tonsila desafiada pela *Salmonella* Heidelberg e ao lado lamina 228 de tonsila não desafiada.



5. CONCLUSÃO

Considera-se que este estudo obteve resultados significativos para o contexto acadêmico de modo que as análises e fotos autorais realizadas no laboratório do Centro Universitário de Brasília - CEUB são de relevância por possuir imagens exclusivas de lâminas histológicas de aves de corte, visto que, alguns estudos raramente aprestam fotos de lâminas com tais alterações, trazendo valor ao projeto e a comunidade acadêmica.

Ademais, os resultados obtidos até o momento indicam que, entre os grupos de aves desafiadas, há uma maior presença de linfócitos no baço. No entanto, entre os grupos de aves não desafiadas, ambos apresentaram números de linfócitos semelhantes. Ao analisar todos os grupos, os não desafiados apresentaram um número menor de linfócitos no baço e nas tonsilas em comparação com as aves desafiadas.

Especificamente o grupo de aves desafiadas que teve o número de linfócitos nas tonsilas foi em média de 84,83 unidades, enquanto o grupo de aves desafiadas que teve o número de linfócitos no baço apresentou a maior média, com 200,83 unidades. Concluindo-se que a *Salmonella Heidelberg* pode provocar o aumento de linfócitos nos tecidos indicando a inflamação e resposta imunológica no organismo das aves de corte, tendo o baço como local alvo da inflamação.

Por fim, o estudo sobre a salmonela deve estar atualizado conforme os anos de modo que o incentivo de novas pesquisas sobre o assunto, corrobore com a compreensão da importância e impacto da doença, tanto na saúde pública, quanto na economia do país. Isso se deve pois o Brasil é um grande produtor de produtos de origem animal, sendo de extrema relevância a atuação do médico veterinário na área de produção e pesquisas pois garante a segurança alimentar dos consumidores e mantém tanto a saúde como o bem-estar humano e animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Arthur Sffair de. **Salmonella Heidelberg em aves e na saúde pública**. Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento. 2018. 29 p. TCC (Graduação em Medicina Veterinária) - FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2018.
- ANDREATTI F. R. L.; Patrício I. S. **Biosseguridade na granja de frangos de corte**. In: Mendes AA.; Naas IA.; Macari M. Produção de frangos de corte. 1. Ed. Campinas: Facta, 2004. P. 169-177.
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 70, De 06 De Outubro De 2003**. Brasília: Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, 2003.
- DARWIN, K. Heran; MILLER, Virginia L. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.
- DESMIDT M.; DUCATELLE R.; HAESBROUCK F. **Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with salmonella enteritidis phage type four**. Poult Sci. 1998; 77: 73-74.
- LUNA L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3 Ed. New York, Mcgraw Hill, 1968, 258p.)
- OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. **Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. Review Article** [online], v.47, n.1-2, p.25-42, 2005. Disponível em: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf Acesso em: 6 Mai. 2022
- PORTER S. B.; CURTISS R. **Effect of inv mutations on Salmonella virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks**. Aviária Diseases [online]. 1997; 41(1): 45-57. Disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1592442?uid=37506&uid=3737664&uid=2129&uid=5909624&uid=2&uid=70&uid=3&uid=37505&uid=67&uid=62&sid=2110118149>
- SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Disease Swine**. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000.
- WILLIAMS M. A. **Quantitative methods in biology**. In: **Glaubert, A. M. Practical Methods In Electron Microscopy**. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977.